

На правах рукописи

ХАЛИУЛЛИНА Алия Владимировна

**СОСТОЯНИЕ И ПОДВИЖНОСТЬ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ В
УСЛОВИЯХ АГРЕГАЦИИ**

Специальность 01.04.07 – физика конденсированного состояния

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре физики молекулярных систем
ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

- Научный руководитель: – доктор физико-математических наук,
профессор
Филиппов Андрей Васильевич
- Официальные оппоненты: – доктор физико-математических наук,
профессор
Чернов Владимир Михайлович
- кандидат физико-математических наук,
доцент
Гиматдинов Рустам Саясович
- Ведущая организация: – Казанский институт биофизики и
биохимии КНЦ РАН, г. Казань

Защита диссертации состоится 22 марта 2012 года в 14 часов 40 минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 16а.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета

Автореферат разослан «__» _____ 2012 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.ф.- м.н., профессор

Еремин М.В.

Актуальность проблемы.

Под агрегацией понимают широкий класс явлений от ассоциации органических молекул в растворе или в жидкокристаллической фазе за счет нековалентных взаимодействий до роста полупроводниковых нанокристаллов на твердой подложке [1]. Исследования процессов агрегации связано со структурой, динамикой и фазовым поведением взаимодействующих молекул, а также природой межмолекулярных взаимодействий, их энергией и ролью в процессе агрегации. В этой связи особый интерес вызывает изучение биомакромолекул (прежде всего – белков и нуклеиновых кислот), поскольку они обладают уникальной способностью к структурной самоорганизации в сложные, функционально значимые для живой материи, надмолекулярные системы. В современных исследованиях агрегации биомакромолекул ядерный магнитный резонанс (ЯМР) является одним из самых эффективных методов, что связано с возможностью получения селективной структурно-динамической информации, являющейся крайне важной для понимания этого процесса.

Наиболее распространенными биомакромолекулами являются белки, для многих из которых (к примеру, для мембранных белков), агрегация лежит в основе реализации функций по поддержанию жизнедеятельности клетки. Поэтому, понимание процесса агрегации белков важно с точки зрения фундаментальных основ функционирования клеточных структур. Агрегация белков может иметь и негативное значение для организма, к примеру, при «неправильном» сворачивании белка образуются пучки высокоупорядоченных структурных полимерных нитей – амилоидные фибриллы. С возникновением амилоида связаны ряд заболеваний, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, атеросклероз, диабет II типа и т.д. Несмотря на интенсивное изучение особенностей образования амилоидных фибрилл, мало изученными остаются начальные стадии агрегации, а также процессы агрегации белков в биомембране. В частности, важным является обнаружение олигомерного состояния и динамики молекул белков в условиях агрегации.

В данной работе методами ЯМР спектроскопии твердого тела исследовались структурно-динамические свойства отдельно синтезированного порообразующего трансмембранного сегмента M1 канального белка MchV (механочувствительный канал высокой проводимости) и антимикробного пептида грамицидина S при их агрегации в биомембране. Изучалась агрегация амилоидного A β пептида и белка лизоцима в растворах на начальных стадиях с использованием метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля (ИГМП), позволяющим изучать трансляционную подвижность молекул.

Цель работы состояла в изучении структурно – динамических особенностей белков при их агрегации в растворе, а также в модельных биомембранах методами ЯМР диффузометрии и ЯМР спектроскопии твердого тела.

Научная новизна.

1. Впервые методом ЯМР диффузометрии показано, что для белка лизоцима при его изотермической агрегации димеры являются необходимыми промежуточными структурами агрегации.
2. На основе данных ЯМР диффузометрии обнаружено, что замораживание, традиционно считавшееся способом предохранения биологических систем от агрегации, само способно привести к образованию неупорядоченных β -структурных агрегатов. Кроме того, агрегацию пептидов способно вызвать ультразвуковое воздействие, часто применяемое для приготовления белковых растворов.
3. Для исследования агрегации мембранных белков продемонстрирована эффективность применения подхода, основанного на внедрении в структуру мембранных пептидов CF_3 -групп, как селективных и высокочувствительных ЯМР ^{19}F меток.
4. Методом ^2H -ЯМР твердого тела впервые проведено исследование ориентации пептида М1 в мембране, характеризуемое, главным образом, углом между осью α -спирали пептида М1 и нормалью к плоскости мембраны.
5. На основе экспериментальных данных измерений времен T_2 релаксации на ядрах ^2H оценено время корреляции вращения М1 пептида в мембране и показано, что оно характерно для молекулярной подвижности не отдельных пептидов М1, а их структурных агрегатов.

Практическая значимость.

1. Возможность получения методом ЯМР диффузометрии информации о промежуточных структурах агрегации белков в растворе, особенностей структуры агрегатов и кинетики процесса агрегации может быть использована для решения задач, связанных с исследованием амилоидных фибрилл, возникающих в ряде конформационных заболеваний.
2. Данные ЯМР диффузометрии о влиянии ультразвукового воздействия и низкотемпературного режима хранения образцов на агрегацию А β пептида в растворе могут быть использованы для оптимизации способа приготовления растворов белков.
3. Показана эффективность применения импульсной последовательности КПМГ для регистрации ЯМР спектров, обусловленных гомоядерными диполь-дипольными взаимодействиями между ядрами ^{19}F как внутри, так и между CF_3 группами. На основании проведенного анализа этих спектров могут быть определены: а) внутримолекулярные расстояния, являющимися важными для установления конформации белка в мембране, б) углы между межъядерными векторами и направлением магнитного поля, что позволяет судить о расположении белка к плоскости мембраны.
4. Полученные экспериментальные результаты при исследовании агрегации пептида М1 в мембране могут быть использованы как для развития теоретических представлений о механизме работы каналов в мембране, так и для понимания процесса самоорганизации белков в целом.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Апробация работы. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на Четвертой научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научного образовательного центра КГУ (Казань, Россия, 2004 г.); Итоговой научной студенческой конференции КГУ (Казань, Россия, 2004 г.); XI Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, Россия, 2004); 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пущино, Россия, 2006 г.); XIII Всероссийской конференции «Структура и динамика молекулярных систем» (Яльчик, Россия, 2006); Международном конгрессе «Магнитный резонанс для будущего» EUROMAR-2008 (Санкт-Петербург, Россия, 2008); а так же на семинарах кафедры молекулярной физики КГУ (Казань, Россия, в период 2004-2008 гг.), кафедры биохимии института органической химии университета Карлсруэ (Карлсруэ, Германия, 2005-2008 гг.) и лаборатории биомембранных структур университета Оксфорд (Оксфорд, Великобритания, 2008).

Публикация результатов исследований. Всего публикаций по теме диссертации 11, в том числе в изданиях рекомендованных ВАК – 3 статьи.

Личный вклад автора. Соискатель принимал непосредственное участие в постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, а так же обсуждение результатов. Соискателем лично было проведена систематизация литературных данных, обобщение, анализ и оформление полученных результатов.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, включая литературный обзор, результатов и обсуждения, заключения и выводов. Общий объем работы составляет 148 страниц, включая 50 иллюстраций, 4 таблицы и список литературы, содержащий 189 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** в форме аннотированного изложения глав диссертационной работы приводятся ее основные результаты, обосновывается актуальность темы, формулируется цель диссертации, описывается научная новизна и практическая значимость проведенных исследований.

Первая глава посвящена обзору современных представлений о структуре белков в растворе и биомембране, их функциях и значении агрегации. Обсуждаются возможности применения ЯМР спектроскопических методов для исследования подвижности белков, их взаимодействия между собой и с липидами биомембраны, а также для определения структуры мембранных белков и пептидов. Особое внимание уделяется методу ЯМР диффузометрии для исследования агрегации белков в растворе и методам ЯМР твердого тела для изучения структурно-динамических характеристик пептидов в мембранном окружении.

Во **второй главе** рассматриваются необходимые для понимания работы теоретические основы явления ЯМР, даны основные характеристики ЯМР спектрометров и применяемых импульсных последовательностей ЯМР, методов кругового дихроизма (КД) и флуоресцентной спектроскопии (ФС).

Приводятся характеристики белков, липидов и других использованных веществ. Описана технология приготовления образцов.

Исследуемые системы.

В соответствии с поставленной целью, объектами исследования являлись белки (рис. 1), способные агрегировать либо в водной среде (плазматические белки), либо в биомембране (мембранные белки).

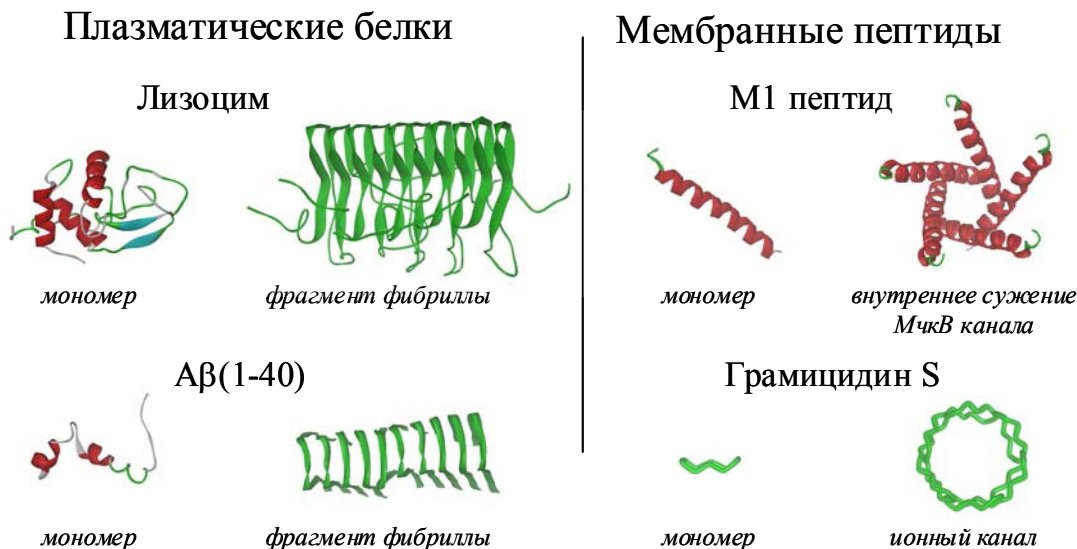


Рис.1. Исследуемые плазматические и мембранные белки в мономерной форме и создаваемые ими агрегаты

В качестве плазматических белков использовали белок лизоцим («Sigma») и амилоидный Aβ₁₋₄₀ пептид (первичная структура: D¹AEFRHDSGY¹⁰EVNHQKL VFF²⁰AEDVGSNKG A³⁰IIGLMVGGVV), синтезированные стандартным твердофазным методом (FMOC) в Университете Лулео (Швеция). Молекулярная масса (M_w) лизоцима и Aβ₁₋₄₀ пептида 14,6 кДа и 4,3 кДа, соответственно. В качестве растворителей использовали дейтерированные трифторэтанол (ТФЭ) («Sigma»), H₂O и D₂O, либо Трис буфер в D₂O.

В качестве мембранных белков были использованы: антимикробный пептид грамицидин S как нативного типа (первичная структура: цикло – (Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂), так и его аналог (цикло – ((CF₃-Phe)-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂), содержащий фторированные фенилглицины (CF₃-Phe). Также исследовался порообразующий трансмембранный сегмент M1 (R¹³GNVVDLA²⁰VAVIIIGA AFG³⁰KIVSSLVADI⁴⁰IMPPL) белка механочувствительного канала высокой проводимости (МчкВ) нативного типа и его аналог изотопно обогащенный ядрами ²H, ¹³C. M_w пептида M1 = 3 к Да. Пептиды были синтезированы методом FMOC в Университете Карлсруэ (Германия).

В качестве модельных бислойных липидных мембран были использованы ориентированные на поверхности стеклянных пластинок липидные мультибислои [2], для приготовления которых использовались липиды («Avanti»): 1,2-Димиристоил-*sn*-Глицеро-3-Фосфатидилхолин (ДМФХ).

Экспериментальные методы.

При изучении агрегации белков в растворе применялся комплекс экспериментальных методов: последовательность ЯМР с импульсным

градиентом магнитного поля (ИГМП) для исследования трансляционной подвижности молекул (рис.2А); метод КД для определения вторичных структур белков; метод ФС для обнаружения амилоидных фибрилл.

При исследовании агрегации пептидов в модельных биомембранах были использованы следующие ЯМР методики: спад свободной индукции (ССИ) с развязкой от протонов на ядрах ^{31}P для оценки степени ориентации липидов, и на ядрах ^{19}F для оценки ориентации и вращательной подвижности молекул пептидов в бислоях; импульсная последовательность Кара-Парселла-Мейбума-Гилла (КПМГ) для определения констант диполь-дипольного взаимодействия между селективно введенными трифторметил-группами, которые связаны со структурно-динамическими характеристиками белков (рис.2Б) [3]; последовательность «твердотельное эхо» для записи спектров ядерного квадрупольного взаимодействия на ядрах ^2H (рис.2В); последовательность Q-КПМГ для измерения времен T_2 релаксации на ядрах ^2H (рис.2Г), а также метод двойного резонанса вращательного эха REDOR (от «*rotational echo double resonance*») для выявления межмолекулярных контактов между пептидами М1.

Коэффициенты самодиффузии в эксперименте ЯМР с ИГМП определялись из диффузионных затуханий (ДЗ) сигнала стимулированного спинового эха $A(2\tau, \tau_1, k^2)$, полученных в координатах $\log[A(2\tau, \tau_1, k^2)/A(2\tau, \tau_1, 0)]$ vs $\log(k^2 t_d)$ при варьировании одного из двух параметров g или δ (рис.2А). Для системы, молекулы которой характеризуются одним значением КСД, амплитуда сигнала стимулированного спинового эха описывается выражением [4]:

$$A(2\tau, \tau_1, k^2) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \exp(-k^2 D t_d) = A(2\tau, \tau_1, 0) \exp(-k^2 D t_d) \quad (1)$$

где $k^2 = \gamma^2 \delta^2 g^2$, γ – гиромагнитное отношение протонов, δ и g – длительность и амплитуда импульсного градиента магнитного поля, $A(0)$ – амплитуда эхо в начальный момент времени; T_1 и T_2 времена продольной (спин-решеточной) и поперечной (спин-спиновой) релаксации ЯМР; γ – гиромагнитное отношение; D – коэффициент самодиффузии (КСД).

В случае многокомпонентных систем, характеризующихся наличием набора КСД и времен релаксации, диффузионное затухание стимулированного эхо описывается выражением вида:

$$A(2\tau, \tau_1, k^2) / A(2\tau, \tau_1, 0) = \sum_i p'_i \exp(-k^2 D_i t_d), \quad (2)$$

$$p'_i = p_i \exp(-2\tau/T_{2i} - \tau_1/T_{1i}) / \sum_i p_i \exp(-2\tau/T_{2i} - \tau_1/T_{1i}),$$

где p'_i – кажущиеся населенности, характеризующиеся КСД D_i

Спектры, обусловленные гомоядерным диполь-дипольным (ДД) взаимодействием, получали путем Фурье преобразования огибающей сигналов (максимумов) спиновых эхо, формирующихся в промежутках между 180° импульсами в эксперименте КПМГ. Заметим, что вклады от ядерного магнитного экранирования и гетероядерного ДД взаимодействия усредняются до нуля, поэтому в этом эксперименте не применяется развязка от протонов.

Время корреляции вращательной диффузии τ_c пептидов М1 в мембране оценивалось на основании анализа времен поперечной релаксации T_2 ядер ^2H ,

измеренных с помощью последовательности Q-КПМГ. Для этого использовалось соотношение [5]:

$$1/T_2 \propto \tau_c (1 - \tau_c / \tau \tanh \tau / \tau_c) \quad (3)$$

где τ -время между 90° импульсами последовательности Q-КПМГ (рис.2Г).

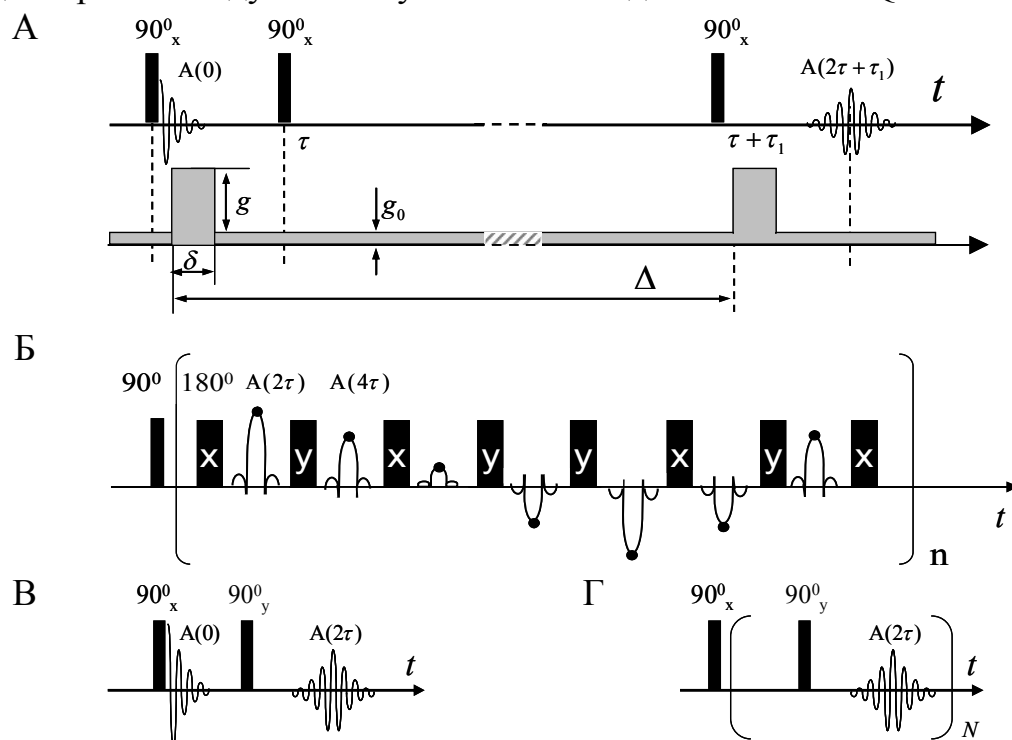


Рис.2. А) Импульсная последовательность «стимулированного эхо» для измерения коэффициентов самодиффузии, где τ – интервал между 1-м и 2-м 90° рч импульсами, а τ_1 – интервал между 2-м и 3-м 90° рч импульсами, $A(0)$ - амплитуда сигнала ЯМР сразу после 90° импульса (ССИ), g и δ – амплитуда и длительность импульсов градиента, g_0 – постоянный градиент, $t_d = \Delta - \delta/3$ – время диффузии. Б) Последовательность КПМГ для получения информации о диполь – дипольном (ДД) взаимодействии в статическом твердотельном эксперименте. В) Последовательность «твердотельное эхо» для записи ^2H спектров; Г) последовательность Q-КПМГ для измерения времен T_2 для ядер ^2H .

Основные характеристики аппаратуры:

Измерения самодиффузии выполняли на диффузомере кафедры физики молекулярных систем КФУ (г. Казань, Россия): частота 300 МГц для ^1H , максимальная амплитуда импульса градиента поля 15 Тл/м; и диффузомере Varian/Chemagnetic CMX лаборатории ЯМР химического факультета университета Умео (г. Умео, Швеция): частота 100 МГц для ^1H , максимальная амплитуда импульса градиента магнитного поля 1,15 Тл/м.

Твердотельные ЯМР эксперименты на ядрах ^{19}F и ^2H были выполнены на кафедре биохимии института органической химии университета Карлсруэ (г. Карлсруэ, Германия) на спектрометрах «Avance» фирмы «Bruker» (Германия) с частотой 500 и 600 МГц для ^1H с использованием датчика фирмы «Doty Scientific» (США) с двойным $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ резонансом и датчика фирмы «Bruker» (Германия) с тройным $^1\text{H}/^{19}\text{F}/\text{X}$ резонансом. В датчики были встроены гониометры для ориентирования образца.

Измерения спектров КД выполнялись в лаборатории ЯМР химического факультета университета Умео (г. Умео, Швеция) на спектрополяриметре

Jasco-810 (Япония) в области длин волн 260 – 180 нм. Флуоресценцию тиофлавина-Т измеряли на спектрофлуорметре FluoroMax-2 (Jobin Yvon/Psex Instruments, США) в области длин волн 450–550 нм.

Эксперименты по обработке растворов ультразвуком проводили в ультразвуковой ванне Branson B12 на частоте 50 кГц при выходной мощности 80 Вт.

В третьей главе обсуждаются результаты, полученные методом ЯМР с ИГМП при исследовании агрегации белков в результате воздействия повышенной T и низкого pH (белок лизоцим, 57°C), аномально низкой T (амилоидный A β пептид, -20°C), а также в результате ультразвукового воздействия (амилоидный A β пептид). Основную информацию об изучаемых системах получали из анализа формы диффузионного затухания (ДЗ) и амплитуды сигнала стимулированного спинного эхо.

Лизоцим. Белок лизоцим инкубировался в кислой среде (pH = 4.5 и 2.0) при высокой температуре (57°C), условиях предпочтительных для образования белком термодинамически стабильного состояния «расплавленной глобулы», промежуточного между нативным (глобула) и полностью развернутым (клубок) [6]. На рис.3 представлены диффузионные затухания, полученные для раствора лизоцима при pH=4.5 (рис.3А). Видно, что ДЗ через 2 часа после приготовления образца имеет одноэкспоненциальный вид и характеризуется единственным коэффициентом самодиффузии (КСД) лизоцима $D_1 = 9.24 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$. Значение КСД согласно литературным данным относиться к *мономерам* белка лизоцима [7]. Однако, по истечении, по крайней мере, 24 часов после приготовления образца форма ДЗ усложняется, так что для ее описания требуется ввести, как минимум, две экспоненты, причем для одной из них значение КСД сохраняется D_1 , а для другой КСД $D_2 = 7.33 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$. Появление компоненты со значением КСД заметно меньшим по сравнению с D_1 , очевидно свидетельствует об увеличении размера кинетической единицы самодиффузии. Причиной этого может быть как изменение конформации пептида, так и агрегация молекул пептида. Известно, что конформационное состояние «расплавленной глобулы», в котором находится белок лизоцим в условиях эксперимента, придает белку способность к полимеризации и образованию фибриллярных агрегатов (амилоидов) [8]. Поэтому, главным фактором, приводящим к появлению КСД D_2 наиболее вероятно связать с процессом агрегации. Оценки происходящего изменения размеров кинетической единицы самодиффузии можно попытаться произвести из уравнения Стокса – Эйнштейна для КСД:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (4)$$

где R_H - гидродинамический радиус частицы, а k - константа Больцмана, T - абсолютная температура, η -коэффициент вязкости растворителя. Если принять, что плотности молекулы лизоцима в агрегированном и неагрегированном состоянии не отличаются, то отношение D_1/D_2 будет пропорционально $\sqrt[3]{M_2/M_1}$, где M_1 и M_2 характеризуют массы лизоцима в неагрегированном и агрегированном состоянии, соответственно. Отсюда видно, что уменьшение

КСД D_2 по сравнению с D_1 в ~ 1.26 раза, согласно соотношению 2 соответствует увеличению R_H во столько же раз и соответствует увеличению молекулярной массы в 2 раза. Это значит, что если D_1 относится к *мономерам*, то вышеприведенные рассуждения позволяют отнести коэффициент D_2 к *димерам* лизоцима.

Диффузионные затухания лизоцима в растворах со значением $pH=2.0$ (рис.3Б) уже на начальной стадии эксперимента (через 1 час после приготовления образца) описываются двумя экспонентами. При этом населенность компоненты ДЗ отнесенная к димерам составляла 0.8. Иными словами 80% белка лизоцима находилось в димерной форме.

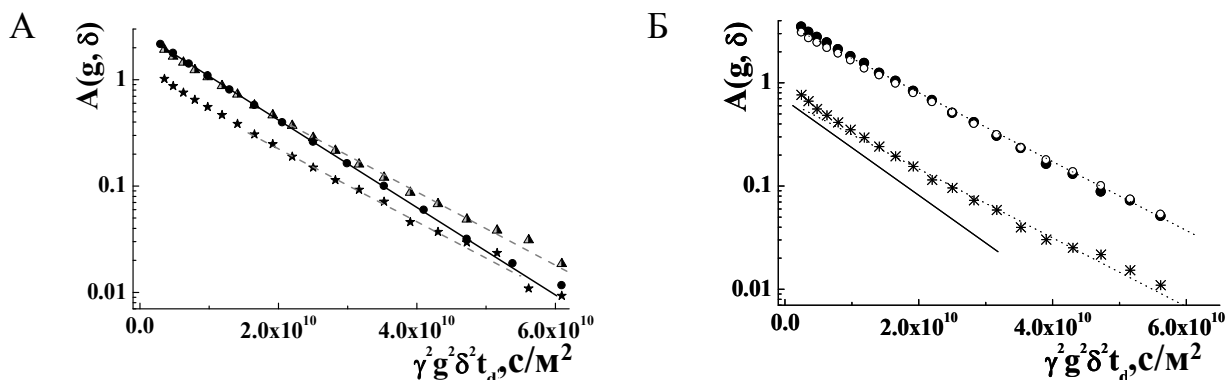


Рис. 3. Диффузионные затухания лизоцима (1.3 мМ) в растворах полученные при различных временах после приготовления образцов: А) 2 (●), 96 (▲) и 528 (★) ч. ($pH=4.5$) и Б) 1 (●), 24 (○) и 240 (★) ч. ($pH=2.0$). Сплошная линия характеризует КСД мономера ($9.24 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$), а пунктирная линия – димера ($7.33 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$). Значение δ варьировали в интервале 0.3-3 мс при фиксированном $g=1.15 \text{ Тл/м}$, $\tau=4.5 \text{ мс}$, $\tau_1=100 \text{ мс}$. $T=21^\circ\text{C}$.

Теперь обратим внимание на другой экспериментальный факт. Через, примерно, 72 часа после приготовления растворов белка с $pH=4.5$ и 24 часа с $pH=2.0$, было замечено относительное уменьшение амплитуды сигнала спинового эхо, что коррелировало с наблюдавшимся появлением белкового осадка. Как уже говорилось ранее, согласно литературным данным [8] в этих условиях образуются амилоидные фибриллы. Таким образом, есть основания полагать, что наличие белкового осадка может быть связано с образованием фибрилл. Для проверки существования связи между уменьшением амплитуды сигнала спинового эхо и появлением белкового осадка нами дополнительно были проведены релаксационные измерения. Было установлено, что времена спин-спиновой релаксации для лизоцима в состоянии осадка характеризовались значениями $T_2 \lesssim 100 \text{ мкс}$. Поскольку в условиях эксперимента ЯМР ИГМП с использованием импульсной последовательности «стимулированного эхо» (рис.2А) минимальное значение τ составляло 3 мс, очевидно, что в сигнале спинового эхо вклад от молекул лизоцима в осадочном состоянии был пренебрежимо мал. Другими словами, диффузионное затухание спинового эхо было обусловлено только вкладами от мономеров и димеров лизоцима:

$$A(t, k)/A(0, 0) = p_1(t) \cdot \exp(-kt_d D_1) + p_2(t) \cdot \exp(-kt_d D_2) \quad (5)$$

где $k=\gamma^2\delta^2g^2$, γ – гиромагнитное отношение протонов, δ и g – длительность и амплитуда импульсного градиента магнитного поля, t – время после

приготовления образца; $p_1(t)$ и $p_2(t)$ – населенности компонент, отнесенных к мономерам и димерам лизоцима, соответственно. Если амплитуду спинового эхо $A(0,0)$ принять за 1, то из последующего изменения амплитуды можно оценить долю выпавшего в осадок лизоцима $p^*(t) = 1 - p_1(t) - p_2(t)$. В связи с этим, может быть проанализирована кинетика агрегации лизоцима.

Кинетические зависимости $p_2(t)$ и $p^*(t)$ (рис.4) могут быть охарактеризованы тремя периодами: индукционным периодом (см. А), в котором наблюдается образование димеров (см. кривая 1 и 2), периодом быстрого роста количества молекул лизоцима (см. Б), выпавших в осадок (см. кривая 3) и периодом установления динамического равновесия между мономерами, димерами и молекулами лизоцима в агрегированном состоянии (см. В). Для раствора со значением pH=2.0 динамическое равновесие устанавливается, начиная со 100 часов после приготовления белкового раствора. Из кинетических кривых видно, что появление агрегатов и их рост происходит только после образования димеров и прекращается когда фракция димеров в растворе понижается до определенного критического значения.

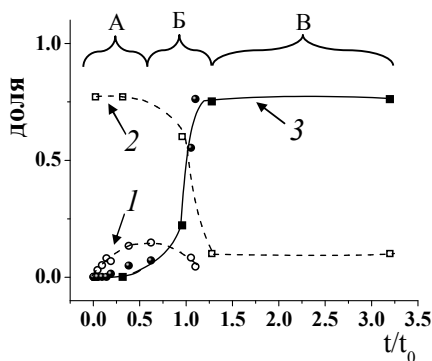


Рис.4. Кинетические зависимости $p_2(t,0)$ и $p^*(t,0)$, относящиеся к димерам лизоцима (кр.1 соответствует раствору с pH=4.5(○); кр.2 для pH=2.0(□)) и агрегатов, выпавших в осадок (кр. 3 соответствует растворам с pH=4.5 (●) и pH=2.0(■)), соответственно. T=21°C. Здесь t_0 – характеристическое время, при котором образуется $\frac{1}{2}$ часть максимальной относительной доли белков в агрегированном состоянии. Для белков в растворе с pH=4.5 $t_0 = 500$ ч., в растворе с pH=2.0 $t_0 = 75$ ч.

Таким образом, на основе данных ЯМР с ИГМП нами показано, что агрегация лизоцима происходит через стадию образования димеров. Этот результат является очень важным, так как начальная стадия агрегации остается мало исследованной по сравнению с ростом амилоидных фибрилл, которые удается наблюдать с помощью микроскопии для лизоцима при его инкубации в условиях эксперимента [8].

Амилоидный Aβ пептид. В отличие от высоких температур, когда может образоваться промежуточное структурное состояние для белка (типа «расплавленная глобула») между полностью развернутой (клубковой) и нативной формами молекул, при относительно низких температурах (с точки зрения физиологии ~0°C и ниже) может происходить «холодная» денатурация, которая характеризуется разворачиванием белковой цепи прямо в клубок, минуя стадию «расплавленной глобулы» [6]. Между тем, процедура замораживания раствора часто используется для хранения белковых растворов.

По данным ЯМР с ИГМП для раствора, подвергнутому замораживанию (-20°C), ДЗ при 20°C представляет собой сумму двух компонент с КСД соответствующим мономерной форме Aβ пептида $D_1 = 1.51 \cdot 10^{-10}$ м²/с, в то время как вторая компонента имеет $D_2 < 1 \cdot 10^{-13}$ м²/с. Оценки при использовании соотношения (4) показывают, что в кинетической единице с КСД D_2 должно

быть не менее 10^4 молекул пептида. Однако глобулярные белки такого размера не должны давать вклад в сигнал спинного эхо ^1H ЯМР из-за коротких времен T_2 релаксации [7]. Вместе с тем, визуально мы наблюдали помутнение раствора. Это означает, что размер агрегатов достаточно большой и превышает длину видимого света ($\sim 600\text{нм}$). При этом, спектры КД и усиление флуоресценции тиофлавина демонстрировали образование β -структур, что может являться признаком образования $A\beta$ пептидом амилоидных фибрилл. Причем нами обнаружено, что структура агрегатов, сформированных без замораживания раствора более упорядоченная по сравнению со структурой агрегатов, сформированных в условиях замораживания. Поскольку, в сигнале спинного эхо вклад от фибрилл не наблюдается из-за коротких времен T_2 , то медленная компонента ДЗ может относиться к индивидуальным белкам, испытывающим ограничения, вероятно в некой фибриллярной белковой структуре. Таким образом, можно предположить, что замораживание раствора пептида приводит к образованию неоднородных по структуре агрегатов, в которых часть молекул пептида имеет жесткую β -конформацию, в то время как другая часть молекул ограничена в трансляционной подвижности. Другими словами, сигнал спинного эхо может быть обусловлен вкладами от молекул $A\beta$ пептида свободно диффундирующих в растворе и молекул $A\beta$ пептида, находящихся в полостях фибриллярных агрегатов.

Таким образом, данные самодиффузии свидетельствуют, что в результате замораживания раствора $A\beta$ пептида образуются неоднородные по структуре фибриллярные агрегаты, содержащие полости с захваченными в них молекулами пептида.

Дополнительно, был обнаружен эффект влияния ультразвука (УЗ) на агрегацию $A\beta$ пептида в растворе трифторэтанола (ТФЭ). Отметим, что ТФЭ способен индуцировать образование α -спиральной конформации пептидами. Для белкового раствора без воздействия УЗ ДЗ имеет одноэкспоненциальный вид и характеризуется мономерным КСД $A\beta$ пептида $D_1 = 1.42 \cdot 10^{-10} \text{ м}^2/\text{с}$. После кратковременного воздействия УЗ (до 5 минут) наблюдается появление КСД $D_2 = 7.59 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$, отличающегося от D_1 в 1.87 раз. Оценки согласно уравнению Стокса – Эйнштейна (4) позволяют отнести D_2 к гексамерам $A\beta$ пептида. Длительное воздействие (30 мин) приводит к исчезновению пептидной компоненты ДЗ, свидетельствуя об образовании агрегатов, не вносящих вклад в спинное эхо. Анализ формы спектров КД, свидетельствует о том, что в растворах ТФЭ значительная часть $A\beta$ пептида присутствует в α -спиральной конформации как до, так и после УЗ воздействия. Это позволяет сделать вывод об образовании под действием УЗ в растворе ТФЭ агрегатов $A\beta$ пептида в конформации α -спирали. При этом, визуально появления белкового осадка не наблюдалось.

Четвертая глава содержит оригинальные результаты исследования структурно-динамических свойств порообразующего трансмембранного M1 сегмента механочувствительного канала МчКВ при его агрегации в биомембране.

Известно, что порообразующие M1 сегменты канального белка МчкВ способны в ходе агрегации в мембране формировать «мини» каналы [9] с характерными свойствами нативного белка. В тоже время, молекулярные механизмы образования и биологического функционирования таких каналов мало изучены.

При исследовании агрегации пептида M1 были определены такие параметры как ψ – угол между осью α -спирали пептида M1 и нормалью к ориентированным фосфолипидным бислоям, характеризующий ориентацию пептида относительно плоскости мембраны, а также τ_c – время корреляции вращательного молекулярного движения пептидов в бислое, которое зависит от размера кинетической единицы, участвующей в этом движении.

Значение угла ψ определялось с помощью ЯМР подхода GALA (от «*geometric analysis of labeled alanines*») [10] в диапазоне концентраций M1 пептида от 0.5 до 1% моль. Этот подход подразумевает селективное замещение метильных протонов аминокислот аланинов (Ala) ядрами дейтерия в трансмембранной части пептида. В связи с этим, был синтезирован ряд M1 пептидов, у каждого из которых, содержалась одна CD_3 метка в выбранных позициях Ala 20, 22, 27, 28 (рис.5А). Наличие в структуре пептида замещенных CD_3 групп позволяет получать 2H -ЯМР спектр (Рис.5.Б), из значения квадрупольного расщепления $\Delta\nu_q$ которого можно определить углы θ между $C-CD_3$ связью и направлением магнитного поля (B_0) для каждой отдельной метки (рис.5В). Ориентационная зависимость расщепления $\Delta\nu_q$ в спектре 2H -ЯМР от положения CD_3 групп по отношению к B_0 определяется выражением:

$$\Delta\nu_q = \left(\frac{3}{4}\right) \cdot \chi \cdot (3\cos^2\theta - 1) \cdot S_{mol}, \quad (6)$$

где $\chi = e^2qQ/h$ – константа квадрупольного взаимодействия, θ – угол между связью $C - CD_3$ и направлением B_0 , S_{mol} – параметр порядка молекулярного движения, определяющий долю усреднения квадрупольного взаимодействия ядер 2H молекулярным движением, $0 \leq S_{mol} \leq 1$.

Угол θ непосредственно взаимосвязан с углом ψ , характеризующим расположение пептида в мембране, следующим образом

$$\theta = \varepsilon_{||} (\cos\gamma - \sin\gamma \cos\delta \tan\varepsilon_{||})^2, \quad (7)$$

где $\varepsilon_{||}$ и δ – углы, зависящие от геометрии пептида и позиции CD_3 группы вокруг α -спирали. Наиболее детально расчеты этих углов для α -спирального пептида изложены в литературе [10].

Так, путем аппроксимации ориентационной зависимости величины $\Delta\nu_q$ от позиции метки вокруг α -спирали, расположенной в мембране, были определены параметры $\psi = 28^\circ$ и $S_{mol} = 0.8$ (рис.5.Г).

Полученный в ходе анализа 2H -ЯМР данных параметр $S_{mol} = 0.8$, согласуется с оценками параметра порядка для других трансмембранных пептидов [3], что свидетельствует о правомерности использованного ЯМР подхода.

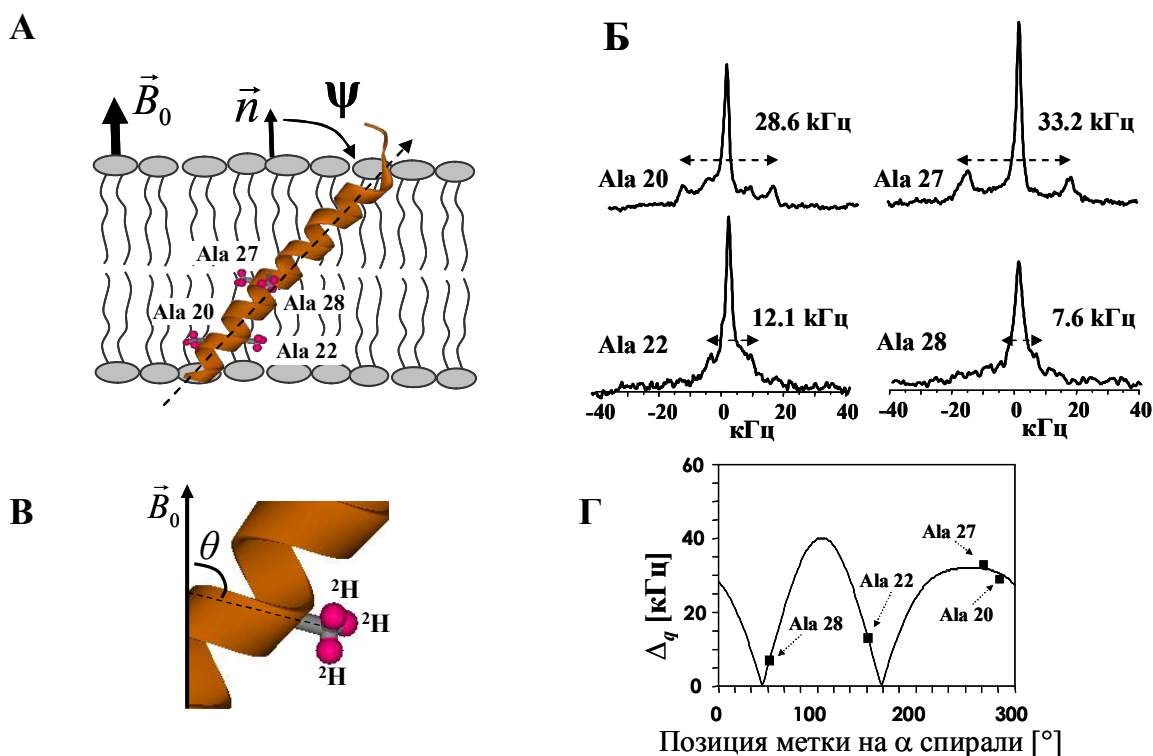


Рис. 5. А) Схематическое изображение М1 пептида расположенного под углом ψ между осью α -спирали пептида и нормалью к ориентированным липидным бислоям. Б) ^2H -ЯМР спектры метильных дейтронов четырех аланинов (Ala) пептида М1. Спектральная линия в центре спектра относится к сигналу от HDO. Ориентация нормали к бислоям вдоль по отношению к направлению \vec{B}_0 . $T = 35^\circ\text{C}$. В) Схематическое изображение ориентации CD_3 группы относительно направления \vec{B}_0 . Г) Кривая наилучшей «подгонки» ориентационной зависимости $\Delta\nu_q$ от позиции CD_3 метки на α -спирали.

Определенное значение угла наклона М1 пептида в мембране ψ отличается от значения угла, характеризующего положение М1 сегмента в составе целого белка МчкВ $\psi = 39^\circ$, полученного из рентгеноструктурных данных [11]. Различие в значениях ψ в первую очередь обусловлено, тем, что данные рентгеноструктурного анализа получены для белка, находящегося в кристаллическом состоянии, в то время как исследование положения М1 пептида методом ^2H -ЯМР производилось в наиболее приближенных к естественным условиям – среда представляла собой липидные бислои в жидкокристаллическом состоянии. В целом, наиболее важным результатом является то, что данные, полученные различными методами, характеризуют наклонное положение М1 в липидной мембране, более того значения углов можно считать сопоставимыми.

Время корреляции τ_c вращательного молекулярного движения М1 пептидов в липидном бислое определялось на основании данных измерений времен T_2 релаксации (рис.6) и составило $\tau_c \sim 18$ мкс.

Согласно литературным данным для таких сравнительно больших белковых молекул, как родопсин (348 аминокислот) или цитохром Р-450 (~500 аминокислот) характерные времена корреляции τ_c составляют 20 мкс и 40 мкс, соответственно [12]. Поэтому, можно предположить, что полученное время $\tau_c \sim 18$ мкс характеризует молекулярную подвижность не отдельных М1 пептидов

(30 аминокислот), а их агрегатов. Используя простейшую гидродинамическую модель [12], основанной на уравнении Стокса-Эйнштейна можно оценить размеры пептидных агрегатов, если представить белковую молекулу в виде цилиндра радиуса a , находящегося в полости бислоя

$$\frac{1}{\tau_c} = D_R = \frac{k_B T}{4\pi\eta a^2 h}, \quad (8)$$

где D_R – коэффициент вращательной диффузии, η – коэффициент вязкости мембраны, h – толщина биологической мембраны, T – абсолютная температура, k_B – постоянная Больцмана. Если принять, что $T=308\text{K}$, $\eta = 0.3 \text{ Па}\cdot\text{с}$, $h=40 \text{ \AA}$, то значение радиуса a составляет $\sim 23 \text{ \AA}$. Полученное значение радиуса a сопоставимо со средним значением радиуса внутренней поры нативного белка МчкВ [11], формируемой М1 сегментами, которое составляет $\sim 20 \text{ \AA}$.

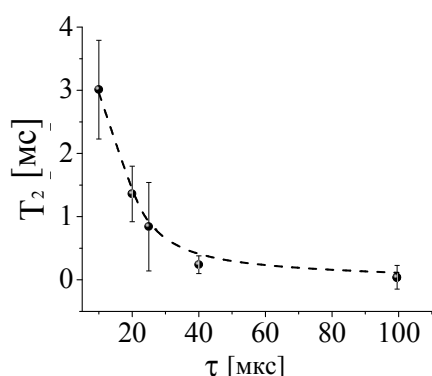


Рис. 6. Зависимость времени T_2 от времени τ между 90° импульсами Q-КПМГ для ядер метильных ядер ^2H в позиции Ala27 М1 пептида в липидных бислоях. $T=35^\circ\text{C}$. Штриховая линия – «подгоночная» кривая, соответствующая $\tau_c \sim 18 \text{ мкс}$ (соотношение 3).

В заключительной части четвертой главы обсуждаются результаты применения ЯМР метода REDOR [11] для определения межъядерных расстояний изотопов $^{13}\text{C} - ^2\text{H}$, принадлежащих таким химическим группам пептидов М1, которые находятся в местах предполагаемых межмолекулярных контактов М1 пептидов во внутренней поре нативного белка МчкВ. Между тем, наблюдать гетероядерное диполь-дипольное взаимодействие между этими ядрами в спектрах REDOR не удалось. Это объяснимо, прежде всего, удаленностью друг от друга М1 пептидов, а также тем обстоятельством, что метод REDOR не всегда эффективен при определении межъядерных расстояний молекул, обладающих сравнительно большой молекулярной подвижностью, как пептиды в жидкокристаллическом состоянии липидных бислоев.

Таким образом, при исследовании агрегации порообразующего трансмембранного М1 сегмента белка МчкВ в модельных биологических мембранах, во-первых, был определен угол ψ наклона пептида М1 по отношению к нормали липидных бислоев, значение которого сопоставимо к таковому при ситуации, когда сегменты М1 находятся в составе МчкВ. Во-вторых, было получено время корреляции τ_c вращения М1 пептидов, значение которого характерно, в соответствии с литературными данными, для белковых агрегатов. При этом оцененный средний размер таких агрегатов сопоставим с размерами внутренней поры нативного белка МчкВ. Однако, из сравнения экспериментальных данных, полученных с использованием методики REDOR,

и существующих представлений об особенностях строения канального белка МчкВ следует, что М1 пептиды в биомембране не образуют структуру, характерную для внутренней поры нативного белка МчкВ. Очевидно, что для полного прояснения ситуации с образованием М1 пептидами «мини» пор, необходимы дальнейшие исследования.

В пятой главе обсуждается практическое применение высокочувствительных ЯМР ^{19}F меток при изучении структурно-динамических свойств мембранных белков на примере пептида грамицидина S в мембране.

Основным преимуществом ядер ^{19}F перед остальными магнитными ядрами, используемыми в качестве селективной ЯМР меток в белковых исследованиях, является, во-первых, то, что эти ядра не имеют никакого естественного содержания, как в белках, так и в липидах. Во-вторых, благодаря высокому гиромангнитному отношению, сравнимым с протонами, ядра ^{19}F имеют сильное межъядерное диполь-дипольное (ДД) взаимодействие. На сегодняшний день разработана схема мечения белков фторированными метками, содержащими как одно ядро ^{19}F , так и несколько ядер, к примеру, CF_3 -группа [3]. Нами впервые применялась схема мечения пептида (грамицидина S) с замещением двух аминокислот валинов (Val) фторсодержащими фенилглицинами ($\text{CF}_3\text{-Phe}$) с целью проверки правомерности применения этих меток при получении информации о конформации белка в мембране, его расположении, а также агрегатного состояния из анализа ЯМР спектров, обусловленных гомоядерным ДД взаимодействием от ядер ^{19}F (рис.7А). Кроме того, важным аспектом исследований являлось определение возможностей применения импульсной последовательности КПМГ для определения констант гомоядерного ДД взаимодействия между селективно введенными трифторметил-группами, которые связаны со структурно-динамическими характеристиками белков. Одним из ключевых моментов применения метода КПМГ для этих целей, является отсутствие в необходимости вращения образца под магическим углом, что дает возможность исследовать белки в ориентированных на стеклянной подложке липидных бислоях, а также не требуется развязка от ^1H .

На рис.7 представлены ЯМР спектры, один из которых получен при использовании одного 90-градусного импульса с развязкой от протонов (рис.7Б), и содержит вклады, обусловленные ядерно-магнитным экранированием и гомоядерным ДД взаимодействием ядер ^{19}F . Другой спектр получен с использованием метода КПМГ (рис.7В), в котором присутствует вклад только от гомоядерных ДД взаимодействий между ядрами ^{19}F .

Важным обстоятельством является то, что в спектре, полученном с помощью эксперимента КПМГ, можно разрешить триплет с расщеплением $\Delta_{\text{obs}}=220$ Гц, обусловленный взаимодействием ядер ^{19}F внутри CF_3 -группы (*intra- CF_3*), а также малое расщепление ($\delta_{\text{obs}} = 50$ Гц) в центре спектра, связанное с взаимодействием ядер ^{19}F между двумя CF_3 -группами молекулы gS (*inter- CF_3*). Одна из причин, почему здесь удастся детектировать слабые *inter- CF_3* ДД взаимодействия – достаточно длинные времена ядерной T_2 релаксации, связанной с быстрым вращением ядер ^{19}F метильных групп вокруг оси

симметрии, что улучшает спектральное разрешение. Высокая аксиально-симметричная вращательная подвижность молекул белка в жидкокристаллическом состоянии мембраны также благоприятствует наблюдению слабых *inter-CF₃* ДД взаимодействий, как это было продемонстрировано нами на примере молекулы малого размера – фенилуксусной кислоты [13].

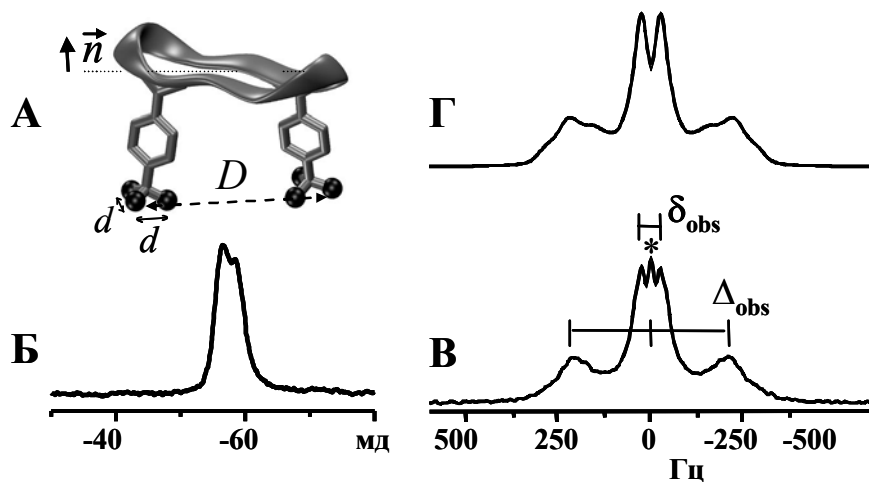


Рис. 7. А) CF₃ меченый аналог грамицидина S, где D и d относятся к *intra-CF₃* и *inter-CF₃* константам диполь-дипольного (ДД) взаимодействия для ядер ¹⁹F внутри и между CF₃-группами, соответственно. Здесь n – нормаль к липидным бислоям. Б) ¹⁹F ЯМР спектр, полученный Фурье преобразованием ССИ; В) ¹⁹F ЯМР спектр, полученный с использованием КПМГ эксперимента, где расщепления $\Delta_{\text{obs}} = 220$ Гц и $\delta_{\text{obs}} = 50$ Гц в спектре соответствуют *intra-CF₃* и *inter-CF₃* ДД взаимодействию, соответственно; Г) расчетный спектр. Пик (*) в центре спектра В) – артефакт КПМГ эксперимента.

Кроме того, используя последовательность КПМГ, в спектре ЯМР удастся различить расщепления, характеризующие взаимодействия между ¹⁹F ядрами внутри CF₃-групп аминокислот CF₃-Phe, находящихся в двух различных стерических формах и, как следствие, различающихся расположением относительно направления магнитного поля (рис.8). Для аминокислот существует две зеркально-симметричные стерические формы L и D . Белковые цепи сложены только из остатков L -аминокислот. В нашем случае одна из двух аминокислот CF₃-Phe находилась в D -форме.

При определении структурных параметров пептида грамицидина S в первую очередь были рассчитаны значения констант гомоядерного ДД взаимодействия D и d , относящиеся к *intra-CF₃* и *inter-CF₃* взаимодействиям, соответственно путем сопоставления экспериментальных и расчетных спектров (рис.8Г). Гамильтониан ДД взаимодействия для 6-спиновой системы, используемый при расчете спектра, имеет следующий вид:

$$\hat{H}^{DD} = -D \sum_{j=1}^2 \sum_{k=j+1}^3 (3\hat{I}_{jz}\hat{I}_{kz} - \hat{I}_j\hat{I}_k) - D \sum_{j=4}^5 \sum_{k=j+1}^6 (3\hat{I}_{jz}\hat{I}_{kz} - \hat{I}_j\hat{I}_k) - d \sum_{j=1}^3 \sum_{k=4}^6 (3\hat{I}_{jz}\hat{I}_{kz} - \hat{I}_j\hat{I}_k) \quad (9)$$

Результатом анализа спектров являются значения констант гомоядерного ДД взаимодействия $D = 85$ Гц и $d = -19$ Гц.

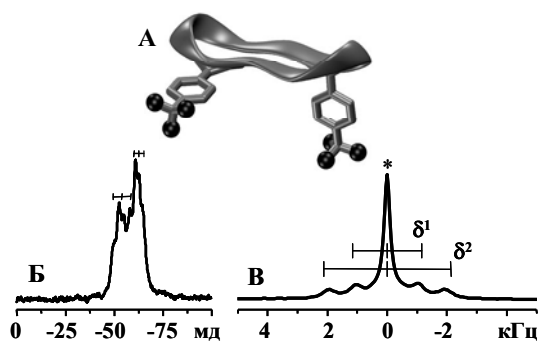


Рис. 8. А) CF_3 меченый аналог грамицидина S, содержащий фторированные фенилглицины ($\text{CF}_3\text{-Phe}$) в двух стерических формах L и D; Б) ^{19}F ЯМР спектр полученный Фурье преобразованием ССИ; В) ^{19}F ЯМР спектр, полученный с использованием КПМГ эксперимента, где расщепления $\delta^1 = 1.16$ кГц и $\delta^2 = 2.13$ кГц. Центральный пик (*) в центре спектра (В) – артефакт КПМГ эксперимента.

Константы ДД взаимодействия (D и d) зависят от расстояния между магнитными ядрами (r_{jk}) и ориентации (θ_{jk}) межъядерного вектора по отношению к внешнему магнитному полю следующим образом: $\sim 1/r_{jk}^3 \cdot (3\cos^2 \theta_{jk} - 1) \cdot S_{mol}$, где j и k – взаимодействующие ядра, S_{mol} – параметр молекулярного порядка. Таким образом, при известной ориентации мембраны относительно направления B_0 , из величины константы D может быть определено расположение молекулы пептида в мембране. В то время как из величины константы d может быть получена информация о расстоянии между CF_3 -группами как внутри молекулы, так и между различными молекулами. Во избежание неопределенности интерпретации данных, связанный со значением S_{mol} , были выбраны условия (концентрация и температура), при которых известно, что молекула грамицидина S располагается в плоскости мембраны с осью симметрии пептида направленной параллельно направлению нормали к бислою ($\theta_{12}=90^\circ$) [14] (рис.7А). При этом, характерный для этого состояния параметр молекулярного порядка S_{mol} находится в диапазоне от 0.3 до 0.5 [3]. При данных S_{mol} , расстояние между CF_3 группами, рассчитанное из величины константы d , составляет $r_{12} = (9.4\text{-}11.1)\text{\AA}$, что не согласуется с расстоянием, рассчитанным на основе нативной структуры грамицидина S ($r_{12} = 8.4 \text{\AA}$) [15]. Рассчитанный из величины D с учетом знания расстояния ($r_{11}=2.1\text{\AA}$) между ядрами ^{19}F в CF_3 группе, угол наклона для CF_3 метки относительно направления B_0 составляет $\theta_{11}=(52.8 - 53.5)^\circ$, то значительно отличается от аналогичного угла, рассчитанного на основе нативной структуры грамицидина S ($\theta_{11}=19^\circ$).

Обнаруженные различия в расстояниях и углах могут свидетельствовать о нарушении структуры грамицидина S вследствие применения меток $\text{CF}_3\text{-Phe}$, так и влиянием липидного окружения на структуру пептида. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют об очевидной эффективности использования нескольких CF_3 -групп в качестве высокочувствительных ЯМР ^{19}F меток для исследования структурно – динамических свойств пептидов в биомембране. Показано, что с помощью метода КПМГ возможно детектировать не только спектральное расщепление от гомоядерного ДД взаимодействия между ядрами ^{19}F внутри CF_3 -группы, но и спектральное расщепление от взаимодействия ядер ^{19}F между CF_3 -группами, располагающихся на расстоянии до $\sim 9 \text{\AA}$ друг от друга. Кроме того, метод КПМГ может быть применен для исследования стереоизомеризации мембранных пептидов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. В результате исследования агрегации лизоцима в растворе методом ЯМР-диффузометрии показано, что для исследуемой системы характерно наличие мономеров, димеров, а также агрегатов с такими размерами, при которых они характеризуются малыми временами релаксации и не дают вклад в спиновое эхо. Оценены относительные доли молекул лизоцима в мономерном и димерном состоянии.
2. На основе данных ЯМР диффузометрии установлено, что замораживание, традиционно считавшееся способом предохранения биологических систем от агрегации, а также ультразвуковое воздействие способны инициировать агрегацию A β -пептида в растворе.
3. На основании проведенного анализа ^{19}F ЯМР спектров установлено, что антимикробный пептид грамицидин S взаимодействует в основном с гидрофильной частью мембраны, располагаясь на ее поверхности. При этом признаков агрегации грамицидина S не обнаружено.
4. Показано, что применение подхода, основанного на внедрении в структуру мембранных пептидов CF_3 -групп, как селективных и высокочувствительных ЯМР ^{19}F меток, позволяет исследовать подвижность и структуру пептидов в биомембране, а также определять стереоизомерные различия аминокислот в структуре мембранных пептидов.
5. Для регистрации спектров обусловленных гомоядерным диполь-дипольным взаимодействием между ядрами ^{19}F , продемонстрирована эффективность импульсной последовательности КПМГ. Показано, что анализ полученных таким образом спектров позволяет для пептидов в ориентированных липидных мембранах определить такие параметры как: а) внутримолекулярные расстояния, являющимися важными для установления конформации белка в мембране, б) углы между межъядерными векторами и направлением магнитного поля, что позволяет судить о расположении белка по отношению к плоскости мембраны.
6. На основе данных метода ^2H -ЯМР твердого тела установлено, что пептиды M1 (порообразующие трансмембранные сегменты канального белка МчкВ) в мембране находятся преимущественно в ориентированном состоянии. При этом значение угла наклона оси α -спирали пептида M1 по отношению к нормали липидных бислоев близко к таковому, когда сегменты M1 находятся в составе МчкВ.
7. На основе анализа измерений времен T_2 установлено наличие медленной динамики пептидов M1 со значением времени корреляции, характерным, в соответствии с литературными данными, для белковых агрегатов. При этом средний размер таких пептидных агрегатов, оцененный с использованием гидродинамической модели, сопоставим с размерами внутренней поры нативного белка МчкВ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Filippov A.V. Diffusion and aggregation of Alzheimer's A β (1-40)-peptide in aqueous-TFE solution as studied by pulsed field gradient NMR / A. Filippov, **A. Suleymanova**¹, O. Antzutkin, G. Gröbner // J. Applied Magnetic Resonance. – 2005. – V. 29. – P. 439 – 449.
2. Grage, S.L. Solid state NMR analysis of the dipolar couplings within and between distant CF(3)-groups in a membrane-bound peptide / S.L. Grage, **A.V. Suleymanova**, S. Afonin, P. Wadhvani, A.S. Ulrich // J. Magnetic Resonance. – 2006. – V. 183. – P. 77 – 86.
3. Филиппов А.В. Влияние замораживания на агрегацию и самодиффузию амилоидного пептида в водном растворе / А.В. Филиппов, **А.В. Сулейманова**, О.Н. Анцуткин, Г. Грёбнер // Коллоидный Журнал. – 2008. – V. 29. – P. 439–449.
4. **Сулейманова А.В.** Исследование самодиффузии амилоидного пептида A β (1-40) в смеси растворителей TFE – D₂O методом ЯМР с ИГМП / А.В. Сулейманова, А.В. Филиппов // Сб. науч. статей участников Всерос. науч. конф. «Структура и динамика молекулярных систем», Й-Ола: Казань: Уфа: М. – 2004. – Ч. 2; Вып. 11. – С. 184 – 186.
5. **Сулейманова А.В.** Структурный анализ мембранно-связанного пептида грамицидина S из спектров диполь-дипольного взаимодействия между двумя CF₃-группами / А.В. Сулейманова, S.L. Grage, S. Afonin *et al.* // Сб. науч. статей участников Всерос. науч. конф. «Структура и динамика молекулярных систем», Й-Ола: Казань: Уфа: М. – 2006. – Ч. 2; Вып. 13. – С. 276 – 280.
6. **Сулейманова А.В.** Исследование самодиффузии протеина A β (1-40) в трифлуорэтанол – водных растворах методом ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля / А.В. Сулейманова, А.В. Филиппов // Сб. тез. докл. науч. конф. «Материалы и технологии XXI века», Казань, 16-17 марта 2004 г. – С. 79.
7. **Сулейманова А.В.** Изучение самодиффузии амилоидного пептида A β (1-40) в растворах трифлуорэтанол – дейтерированная вода методом ЯМР с ИГМП / А.В. Сулейманова, А.В. Филиппов // Сб. тез. докл. итог. науч. студенч. конф. КГУ, Казань, 14 мая 2004 г. – С. 37.
8. Grage S.L. Detection of Weak Dipolar Couplings Between Two CF₃-Groups in a Membrane Bound Peptide / S.L. Grage, **A.V. Suleymanova**, S. Afonin *et al.* // Abstract Book of the European Magnetic Resonance Conference EUROMAR, The Netherlands, Veldhoven, 3-8 July 2005. – P. 390.
9. **Сулейманова А.В.** Исследование процесса агрегации A β (1-40)-пептида в растворах методом ЯМР с ИГМП / А.В. Сулейманова, А.В. Филиппов // Сб. тез. Всерос. науч. конф. «Биология наука XXI века», Пушкино, 17-21 апреля 2006 г.
10. **Suleymanova A.V.** Self-Assembly of the pore-forming peptide of the mechanosensitive channel MSCL studied by solid state NMR / A.V. Suleymanova, S.L. Grage, J. Burck *et al.* // Abstract Book of the European Magnetic Resonance Conference EUROMAR, St. Petersburg, Russia, 6-11 July 2008. – P. 189.

¹ Ныне Халиуллина А.В.

11. Filippov A.V. NMR Study of Oligomeric State and Molecular Mobility of Aggregating Proteins / A.V. Filippov, **A.Suleymanova**, G.Gröbner, O.Antzutkin // Abstract Book of the European Magnetic Resonance Conference EUROMAR, St. Petersburg, Russia, 6-11 July 2008.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Whitesides G. M. Self-Assembly at All Scales / G.M. Whitesides, B. Grzybowski // Science. – 2002. – V. 295. – P. 2418 – 2421.
2. Oradd G. NMR in macroscopically oriented lyotropic systems / G. Oradd, G. Lindblom // Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. – 2003. – Chapter 18. – P. 399 – 418.
3. Ulrich A. Solid state ^{19}F -NMR methods for studying biomembranes / A. Ulrich // Prog. Nucl. Magn. Reson. Spect. – 2005. – V. 46. – P. 1 – 21.
4. Маклаков А.И. Самодиффузия в растворах и расплавах полимеров: монография / А.И. Маклаков, В.Д. Скирда, Н.Ф. Фаткуллин. – Казань: Изд-во Казанского гос. ун-та, 1987. – 224 с.
5. Blicharski J.S. Nuclear-spin relaxation in the presence of MW-4 multipulse sequence / J.S. Blicharski // Can. J. Phys. – 1986. – V. 64. – P. 733–735.
6. Финкельштейн А.В. Физика белка / А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын. – 3-е изд. – М.: КДУ, 2005. – 456 с.
7. Price W.S. Lysozyme Aggregation and Solution Properties Studied Using PGSE NMR Diffusion Measurements / W.S. Price, F. Tsuchiya, Y. Arata // J. Am. Chem. Soc. – 1999. – V. 121. – P. 11503 – 11512.
8. Morozova-Roche L.A. Amyloid Fibril Formation and Seeding by Wild-Type Human Lysozyme and Its Disease-Related Mutational Variants / L.A. Morozova-Roche, J. Zurdo, A. Spencer *et al.* // J. Structural Biology. – 2000. – V. 130. – P. 339 – 351.
9. Park K.-H. Purification and functional reconstitution of N- and C-halves of the MscL channel. / K.-H. Park, C. Berrier, B. Martinac *et al.* // Biophys. J. – 2004. – V. 86. – P. 2129 – 2136.
10. Wel P.C. Geometry and intrinsic tilt of a tryptophan- anchored transmembrane α -helix determined by ^2H NMR / P.C. Wel, E. Strandberg, J.A. Killian *et al.* // Biophys J. – 2002. – V. 83. – P. 1479 – 1488.
11. Sukharev S. The gating mechanism of the mechanosensitive channel MscL / S. Sukharev, M. Betanzos, C. Chiang *et al.* // Nature. – 2001. – V. 409. – P. 720.
12. Геннис Р. Биомембраны / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624 с.
13. Grage S.L. Solid state NMR analysis of the dipolar couplings within and between distant CF_3 -groups in a membrane-bound peptide / S.L. Grage, A.V. Suleymanova, S. Afonin *et al.* // J. Magn. Reson. – 2006. – V. 183. – P. 77 – 86.
14. Ulrich A.S. Solid state ^{19}F -NMR analysis of oriented biomembranes: Handbook of Modern Magnetic Resonance / A.S. Ulrich, T. Asakura, H. Saito *et al.* // Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. – 2006.
15. Xu, Y. / Xu Y., I.P. Sugar, R. Krishna // J. Biomol. NMR. – 1995. – V.5. – P. 37–48.

Автор выражает благодарность

- Коллективу кафедры физики молекулярных систем КФУ и коллективу кафедры биохимии института органической химии университета Карлсруэ (Германия) за поддержку и помощь во время подготовки материалов диссертации.
- Научному руководителю проф. Филиппову А.В. и заведующему кафедрой проф. В.Д.Скирде, а так же д.ф.-м.н. Грааге Ш., д.б.н. Афонину С. и проф. Улрих А. за продуктивные дискуссии и помощь в обсуждении результатов исследований.
- Научно-образовательному центру КГУ (гранты CRDF REC-007-3 и РНП 2.1.1.3222, 2005-2008 г.г.), Российскому фонду фундаментальных исследований (гранты 04-03-32861 и 09-04-01355), Федеральному агентству по образованию (грант СМС № 29.19.49,31.15.03, 2006 г.), Немецкой службе академических обменов DAAD (2006-2007г.г.), а также Научно-исследовательскому центру функциональных наноструктур (CFN) университета Карлсруэ (2008-2009 г.г.).